



Trabajo de Fin de Grado (TFG)

Revisión Bibliográfica

Grado en Farmacia

**INHIBIDORES DE BOMBAS DE EFLUJO: NUEVA
ESTRATEGIA FRENTE A RESISTENCIA A LOS
ANTIBIÓTICOS**

Alumna: Marta Carmona Jerez

Tutora: Francine Amaral Piubeli

Departamento de microbiología y parasitología

Facultad de Farmacia

Sevilla, julio de 2022

ÍNDICE

1. Introducción.....	Pág. 3
2. Objetivos.....	Pág. 5
3. Metodología.....	Pág. 5
4. Resultados y discusión.....	Pág. 6
4.1. Descripción de las familias de bombas de eflujo:	
<i>Superfamilia ABC</i>	Pág. 6
<i>Superfamilia de facilitadores principales (MFS)</i>	Pág. 7
<i>Familia de expulsión de toxinas y múltiples fármacos (MATE)</i>	Pág. 8
<i>Superfamilia de resistencia-nodulación-división celular (RND)</i>	Pág. 9
<i>Pequeña familia de resistencia a múltiples fármacos (SMR)</i>	Pág. 11
<i>Familia de eflujo de compuestos proteobacterianos (PACE)</i>	Pág. 12
4.2. Clasificación de los inhibidores de bombas de eflujo:	
<i>Según su origen</i>	Pág. 12
<i>Según su mecanismo de acción</i>	Pág. 17
4.3. Implicación de los inhibidores de bomba de eflujo en la resistencia a los antibióticos	Pág. 19
5. Conclusiones.....	Pág. 24
6. Bibliografía.....	Pág. 25

Resumen. En las últimas décadas, el estudio de las bombas de eflujo bacterianas ha sido clave para conocer el impacto en la multirresistencia a antimicrobianos. La resistencia puede atribuirse al uso indebido y fuera del control sanitario, tanto en el tratamiento de infecciones clínicas como su utilización en sectores alimentarios, siendo una amenaza para la salud pública que alcanza ya niveles globales. Uno de los mecanismos de resistencia más extendidos es la capacidad de exportación de medicamentos mediante sistemas de eflujo. Las bombas de eflujo no solo intervienen en la expulsión del fármaco fuera de la célula bacteriana, sino que son la causa principal de la virulencia y adaptación que inducen la resistencia a los antimicrobianos en el transcurso de la infección. La inhibición de estas bombas es una estrategia de interés, ya que el descubrimiento y la síntesis de nuevos antibióticos está disminuyendo. Esta revisión se centra en la descripción de los distintos inhibidores de bombas de eflujo (EPI: *Efflux Pump Inhibitors*), tanto de fuentes naturales como sintéticas, así como de las bacterias a las que afectan. Además, comprobamos el poder inhibitorio de varios EPI en bacterias significativamente clínicas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella Typhimurium*. Los resultados podrían extrapolarse a otras especies bacterianas y constituir una nueva estrategia en la búsqueda de terapias antimicrobianas.

Palabras clave: resistencia, eflujo, EPI, AcrB.

1. Introducción:

La resistencia a antibióticos es ya una crisis de salud pública global. “Alrededor de 33.000 personas mueren cada año en Europa como consecuencia de infecciones resistentes, unas 4.000 muertes en España, lo que supone cuatro veces más que las muertes provocadas por accidentes de tráfico” (1).

Hablamos de resistencia a los antibióticos cuando las bacterias que eran sensibles a ciertos fármacos antibióticos, dejan de ser susceptibles a ellos. Esta susceptibilidad puede ser evaluada en un laboratorio mediante la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), es decir, la concentración mínima de antibiótico necesaria para inhibir el crecimiento de un patógeno bacteriano (2). Este proceso dificulta el tratamiento, aumenta la propagación de las enfermedades derivadas de la infección pudiendo aparecer formar graves y llegar a provocar la muerte (3).

La OMS ya informó en 2014 de este problema de farmacorresistencia, indicando tasas de resistencia al alza en patógenos clínicamente significativos comunes como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. Lo relevante de este informe es que muchas de estas bacterias ya presentaban un fenotipo que otorga resistencia a

múltiples fármacos (MDR), que puede ser debido a uno o más mecanismos de resistencia implicados (4).

El gen de resistencia puede llegar a la bacteria por un proceso evolutivo o por mutaciones (transferencia vertical) y ser transmitido a las sucesivas generaciones por replicación. Otro de los procesos que intervienen en la adquisición de resistencia sería la transferencia horizontal de genes, a través de elementos móviles del genoma bacteriano (5,6).

Los ejemplos tradicionales de resistencia bacteriana pueden suponer la modificación del objetivo de tal modo que altere la conexión de los antimicrobianos con la proteína diana, la eliminación o cambio enzimático de los antimicrobianos y/o el impedimento en el acceso a las dianas celulares por la disminución de la cantidad de fármaco producido por un fenómeno de eflujo (6).

No obstante, de todos los ejemplos citados, son las bombas de eflujo las que se encuentran más extendidas tanto en bacterias Gram positivas como en bacterias Gram negativas. Mientras que algunas bombas de eflujo expulsan de manera selectiva ciertos tipos de antibióticos, otras expulsan diversas clases de fármacos, lo que conduce a la evolución de bacterias resistentes a múltiples medicamentos. Es decir, a bacterias capaces de tolerar más de un antibiótico (7).

Las bombas de eflujo son proteínas transmembranales que actúan extrayendo antibióticos y múltiples fármacos de acción tóxica, por lo que son consideradas como un importante mecanismo de resistencia y protección celular bacteriano. Dependiendo del fármaco o toxina, este mecanismo puede ser el más rápido y efectivo de todos los que posee la bacteria (8).

Las bombas, también llamadas de “expulsión de múltiples fármacos”, se han dividido en seis familias de transportadores en función de su estructura, el número de regiones transmembrana que abarcan, fuentes de energía y sustratos (4): 1) la superfamilia ABC, cuyos transportadores activos se consideran primarios al utilizar la energía de hidrólisis de ATP; 2) la superfamilia de facilitadores principales (MFS); 3) la familia de expulsión de toxinas y múltiples fármacos (MATE); 4) la superfamilia de resistencia-nodulación-división celular (RND), 5) la pequeña familia de resistencia a múltiples fármacos (SMR), que presenta una pequeña extensión conocida como 6) familia de eflujo de compuestos proteobacterianos (PACE). Estos cinco últimos grupos son transportadores activos secundarios que utilizan la energía electroquímica tomada de gradientes iónicos transmembrana (9).

Los patrones de expresión de las bombas ponen de manifiesto una compleja regulación tanto transcripcional como postranscripcional con enlace a muchos procesos celulares, incluyendo el

metabolismo central. No solo juegan un papel importante en la expulsión de compuestos nocivos, sino que se ha visto que pueden transportar toxinas proteicas que aumentan los factores bacterianos de virulencia, además de promover la comunicación célula a célula y la formación de biopelículas protectoras (8).

2. Objetivos:

El objetivo global del presente estudio es realizar una revisión bibliográfica acerca de la implicación de los sistemas de eflujo en la resistencia adquirida de bacterias clínicamente significativas.

Para cumplir con esta finalidad, se realizaron objetivos específicos entre los que encontramos:

- (1) Describir en profundidad las características que diferencian a las seis familias de bombas de eflujo, sus estructuras, los sustratos a los que son afines, las bacterias que las presentan, así como los compuestos que son capaces de inactivar su función, conocidos como inhibidores de bombas de eflujo (EPIs).
- (2) Verificar estudios que han utilizado EPIs de origen natural y sintético como inhibidores de bombas de eflujo y mencionar sus efectos en la resistencia a los antibióticos. Se evalúan fármacos ya existentes, productos procedentes de microorganismos como la Elaiofilina e inhibidores sintetizados *in silico*, entre otros.

3. Metodología:

Se ha realizado una revisión bibliográfica para reunir información sobre la resistencia a antibióticos mediada por bombas de expulsión de múltiples fármacos (MDR), sobre sus características, sobre los inhibidores que presentan cada una de las familias de bombas y las bacterias más significativas de cada grupo. Se han buscado diferentes artículos a través de las bases de datos de la web FAMA de la Universidad de Sevilla, de PubMed, Medline, utilizando palabras clave como “efflux pump”, “resistance”, “inhibitors”, “pathogenicity island”.

Utilizando estos términos, llegamos a los artículos experimentales que sirven como base fundamental de esta revisión. Se comparan los resultados del uso de moléculas inhibidoras de bombas de eflujo para comprender los mecanismos comprometidos en el funcionamiento de las bombas de expulsión. También se seleccionaron las referencias de los artículos considerados relevantes. Además, se consultaron las páginas web de la OMS (*Organización Mundial de la Salud*) y la AEMPS (*Asociación Española de Medicamentos y Productos Sanitarios*).

4. Resultados y discusión:

4.1. Descripción de las familias de bombas de eflujo:

Superfamilia ABC (ATP Binding Casette). Los transportadores de la gran familia ABC son considerados transportadores primarios. Utilizan directamente la energía de unión e hidrólisis de ATP para mediar el porte de solutos hacia el exterior de la célula bacteriana(10) (**Fig. 1**). Estructuralmente, los transportadores ABC manifiestan dominios transmembrana (TMD) que presentan zonas de unión a sustratos y dominios de unión a nucleótidos (NBD) donde se hidroliza el ATP para promocionar el ciclo de transporte de compuestos y toxinas nocivos para la bacteria (8).

Estas bombas de eflujo pueden separarse en dos subgrupos, transportadores homodiméricos y heterodiméricos. Los transportadores tipo ABC heterodiméricos tienen especial importancia en la resistencia antibiótica tanto intrínseca como adquirida de bacterias Gram positivas (7). Los transportadores tipo ABC homodiméricos tienen dos dominios semejantes de unión a nucleótidos, en tanto que los de tipo heterodimérico solo poseen un lugar de unión que no participa en la hidrólisis de ATP (11). “El contacto de la molécula de ATP en este dominio degenerado sirve como comunicación a través de la interfaz del dímero NBD-NBD y así impedir que se disocien completamente”. Por tanto, es una información relevante para poder diferenciar los subtipos ABC heterodiméricos y homodiméricos (12).

El análisis estructural y funcional de los procesos de exportación e importación sugieren que son llevados a cabo mediante la sucesión de cambios conformacionales. Varían de un estado abierto hacia adentro, a un estado cerrado u ocluido y a un estado abierto hacia afuera para exportar los sustratos a través de la bicapa (7,13). Esta sucesión de cambios está ligados a la dimerización y disociación del dominio NBD gracias a la hidrólisis de la molécula de ATP (8).

Las bombas de eflujo tipo ABC están presentes en bacterias clínicamente significativas tales como las pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, que gracias a la bomba MacAB-TolC han adquirido resistencia a los macrólidos como la eritromicina (14); *Staphylococcus aureus* que emplea una bomba conocida como MsrA que le confiere resistencia a los macrólidos y estreptograminas (15); y *Streptococcus* spp. que a través de la bomba PatAB provoca una neumonía resistente a fluoroquinolonas (15).

En bacterias Gram negativas, la bomba MacAB-TolC aporta resistencia a fármacos como antimicrobianos y contribuye a la virulencia. MacB conforma una estructura triple ensamblada con la proteína externa de membrana TolC y con la proteína periplásmica MacA (**Fig. 1**). “Esta bomba produce la salida de antibióticos macrólidos y, además, el transporte de lipopéptidos de

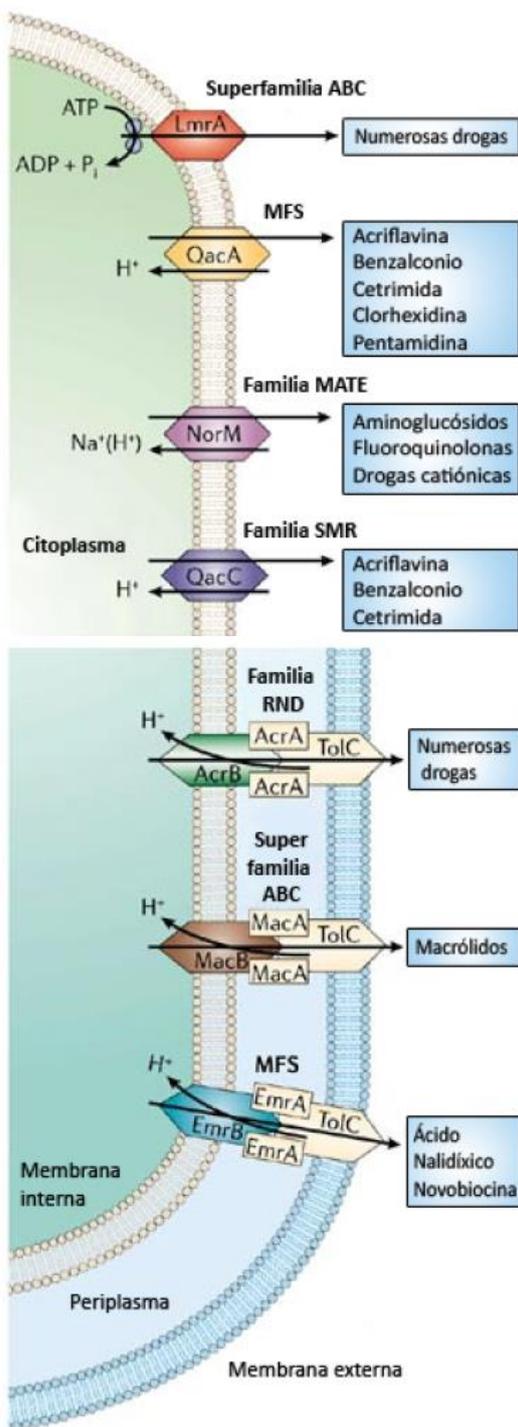


Fig. 1. Esquema representativo de las bombas de eflujo en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, respectivamente (Rosner, 1993).

la membrana externa, protoporfirina, factores de virulencia de polipéptidos y lipopolisacáridos". La hidrólisis de ATP es producida por la proteína MacB, que impulsa el ciclo de transporte (8).

Superfamilia de facilitadores principales (MFS).

Es la familia de transportadores más amplia y con mayor diversidad de las descritas. Presentan un tamaño muy grande en relación con las demás familias de bombas de eflujo en estudio y se ha comprobado que los transportadores tipo MFS están presentes en cada uno de los dominios de la vida (8).

La mayor parte de los componentes de esta superfamilia funcionan como unidades monoméricas únicas. Su longitud oscila entre los 400 y los 600 residuos de aminoácidos; y entre 12 y 14 hélices transmembrana (TMH) estructuradas en dos dominios. Cada dominio está compuesto de seis hélices cada uno (16).

Los miembros MFS pueden subdividirse en uniportadores, simportadores o antiportadores según sea impulsado su ciclo de transporte. Los uniportadores mueven los sustratos mediante la bicapa lipídica sin necesidad de acoplar un gradiente de iones; los simportadores mueven los sustratos gracias al acoplamiento con un gradiente iónico en la misma dirección que el

sustrato; y los antiportadores en su caso, trasladan los sustratos acoplados también a un gradiente de iones, pero en sentido opuesto a la dirección del sustrato (8).

Las referencias estructurales recopiladas avalan la sucesión de cambios conformacionales muy parecidos a los descritos en los transportadores tipo ABC (17). El simportador permeasa de lactosa LacY es el prototipo por excelencia de la superfamilia MFS (16). La información

proporcionada del mecanismo de funcionamiento de LacY muestra que la importancia en la unión del protón y el sustrato en la proteína es la formación un complejo ternario(8). En concordancia con los datos proporcionados, tras la formación del complejo se alternarían los estados de apertura externa y apertura interna similares a los descritos en la superfamilia ABC (16).

Entre las bacterias que utilizan transportadores tipo MFS, destacan la familia *Enterobacteriaceae*, que emplea la bomba EmrAB-TolC (**Fig. 1**), otorgando resistencia a novobiocina y fluoroquinolonas (18); *Staphylococcus aureus* resistente a fluoroquinolonas hidrofílicas, biocidas y antisépticos por su exportación gracias a NorA y QacAB (15) (**Fig. 1**); *Mycobacterium tuberculosis* implacable frente a isoniazida, fluoroquinolonas, tetraciclina y clofazimina mediante el uso de EfpA (19); y *Streptococcus pneumoniae* emplea PmrA para crear resistencia a fluoroquinolonas (15).

Familia de expulsión de toxinas y múltiples fármacos (MATE: *Multimicrobiana Toxicol Extrusion*). Los integrantes de la familia MATE se organizan en subfamilias como NorM, DinF y eucariotas por analogía en su secuencia de aminoácidos (20).

Un análisis estructural revela que los transportadores de las subfamilias NorM y DinF presentan dos paquetes de seis hélices transmembrana (TMH), siendo distintos en su topología a los presentes en la superfamilia MFS (21). En el caso que nos ocupa, los TMH se adaptan en un dominio central con aspecto de V expuesto hacia el espacio extracelular. Por ejemplo, transportador NorM de *Neisseria gonorrhoeae* presenta una cavidad de unión al fármaco cerca de la interfaz membrana-periplasma (22). Este cambio favorece la asimilación del sustrato (23). En el acoplamiento, intervienen enlaces iónicos y de hidrógeno (22,24).

Los transportadores MATE bacterianos impulsan los distintos sustratos mediante fuerza protón-motriz a través de la membrana y/o utilizando gradientes de Na⁺ (**Fig. 1**). Los fármacos que se exportan son de carácter poliaromático y catiónico (20).

El transportador NorM de *Neisseria gonorrhoeae* presenta tres residuos importantes que participan en la coordinación de Na⁺ (Y294, E261 y D377), conservados en gran medida tanto en la subfamilia NorM como en eucariotas y que participarían en el ciclo de transporte (24). La bomba NorM de *Vibrio cholerae* puede expulsar los sustratos mediante las dos vías mencionadas, tanto por gradiente de protones como de Na⁺. Aquí, un residuo de aspartato, D371, es el que interviene en el acoplamiento de H⁺ (25).

Dentro de la subfamilia DinF, destaca el transportador DinF-BH que une los sustratos en el bolsillo central, muy profundamente, donde participan aminoácidos hidrofóbicos para favorecer la interacción (22,24). Otro integrante de la subfamilia DinF, PfMATE, presenta el sitio de unión al sustrato en el interior del dominio amino-terminal donde predominan aminoácidos polares (20).

El sustrato y el catión, ya sea Na⁺ o H⁺, interactúan con diferentes aminoácidos y pueden unirse a la proteína a la misma vez, por eso es probable que el acoplamiento entre el gradiente de Na⁺ y el sustrato sea indirecto y esté mediado por cambios conformacionales en la proteína (8).

Como hemos descrito anteriormente, un ejemplo significativo de bacterias que utilizan las bombas MATE es *Neisseria gonorrhoeae* que mediante NorM ha adquirido resistencia a fluoroquinolonas hidrofílicas (26). Otro ejemplo incluye a *Streptococcus pneumoniae* que es resistente a cloranfenicol y eritromicina gracias a PdrM, otra subfamilia de bombas de eflujo MATE (15).

Superfamilia de resistencia-nodulación-división celular (RND). Los transportadores más importantes desde el punto de vista clínico en cuanto a bacterias Gram negativas son los integrantes de la familia RND. Entre las diferentes especies, los sistemas RND están altamente conservados y la genómica comparativa muestra que las bombas de eflujo en *E. coli* (AcrB), *Pseudomonas aeruginosa* (MexB), *Campylobacter jejuni* (CmeB), *Acinetobacter baumannii* (AdeB) y *Neisseria gonorrhoeae* (MtrD) presentan niveles altos de homología. Para todas ellas se han capturado estructuras en alta resolución (27–29).

Las proteínas RND son en comparación más grandes que otras proteínas presentes en la membrana bacteriana y los integrantes de esta familia forman estructuras de tres componentes u homotrímeros (8). También existen dentro de este grupo subfamilias que incluyen estructuras cuaternarias, como HpnN homodimérico que dota a la membrana externa de hopanoides para regular su fluidez (30); SecDF heterodimérico que es una pieza clave en la exportación de proteínas (31); y el eucariota monomérico NPC1 que participa en la homeostasis del colesterol (32).

Tres grandes dominios conforman el protómero (unidad estructural de una proteína oligomérica) RND bacteriano: los dominios transmembrana (TMD), el dominio de poro y el dominio de acoplamiento que incluye una proteína accesoria periplásmica, en caso de que la proteína RND forme parte de una estructura triple ensamblada. El dominio del poro es el punto crítico en la importación del fármaco (33). Los TMD propician el flujo de protones, que se acopla al ciclo de salida del sustrato en el dominio del poro (34).

El subtipo AcrB en *E. coli* experimenta cambios con el acoplamiento del fármaco. Pasa por distintas conformaciones: los fármacos se insertan en el estado L (estado relajado), se mueven hacia la cavidad de unión en el estado T (estado cerrado u ocluido) y luego se expulsan por una especie de cañón en forma de embudo en el estado O (estado abierto). Los fármacos se mueven durante el cambio conformacional, pero sin poder filtrarse de nuevo al periplasma, por ello se conoce como “mecanismo peristáltico por la similitud con el proceso físico” (35).

Las estructuras de AcrB ligadas a los distintos sustratos muestran la diversidad de compuestos que el transportador puede desalojar. Los sustratos de los transportadores RND engloban compuestos con cierto carácter lipófilo, pero también catiónicos, neutros (cloranfenicol y disolventes) o ácidos (β -lactámicos). Los sustratos con grupos hidrofílicos prefieren unirse a la zona con residuos hidrofílicos y cargados, pero los ligandos hidrofóbicos como el ciclohexano y el cloranfenicol quedan excluidos, ya que no necesitan superficies de interacción pequeñas y no requieren solvatación (36). También se ha demostrado que las moléculas de agua, que asientan la unión de sustratos e inhibidores (37,38) están implicadas en el transporte de fármacos al asistir a las interacciones sustrato-proteína de forma compatible con la diversa especificidad de AcrB (39).

Las bombas de eflujo tipo RND están presentes en bacterias clínicamente significativas, donde se incluyen *Acinetobacter baumannii* que utiliza la bomba de eflujo AdeABC y otorga resistencia a tetraciclinas, tigeciclina, aminoglucósidos, fluoroquinolonas, cloranfenicol, cefotaxima, eritromicina y trimetoprim (40); *Mycobacterium tuberculosis* que a través de la bomba de eflujo MmpS5-Mml5 presenta resistencia a isoniazida, rifampicina, diarilquinolinas (quinoleína) (19); la familia *Enterobacteriaceae* que utiliza estructuras “tripartitas” AcrAB-TolC y OqxAB-TolC para crear resistencia a fluoroquinolonas, β -lactámicos, novobiocina, tetraciclina, eritromicina, linezolid, ceftriaxona, quinolonas, cloranfenicol, nitrofurantoina (41). *Burkholderia* spp. utiliza la bomba de eflujo BpeEF-OprC haciéndola resistente al trimetoprim (42); *Pseudomonas aeruginosa* (MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN y MexXY-OprM) resistente a β -Lactámicos y aminoglucósidos (26); *Neisseria gonorrhoeae* resistente a aminoglucósidos, β -Lactámicos, macrólidos, ceftriaxona gracias a la bomba MtrCDE (26).

Dentro de esta gran familia, el sistema AcrAB-TolC (**Fig. 1**) de *E. coli* ha sido el más estudiado. Su papel en la multirresistencia antibiótica dentro de la familia *Enterobacteriaceae* ha sido avalada por diversos estudios (7). La bomba de expulsión comprende tres proteínas: AcrA, localizada en el espacio periplásmico (pertenece a la familia MFS); AcrB, una proteína transportadora que se encuentra en la membrana citoplasmática interna; y TolC, una proteína de membrana externa.

Los solutos son captados desde el citoplasma o desde la bicapa lipídica gracias a AcrB y son expulsados al espacio extracelular a través de la proteína TolC, el cual forma un canal en la membrana. El proceso está mediado por AcrA, considerada una proteína periplásmica accesoria (8).

Dentro de la familia *Enterobacteriaceae*, la proteína TolC puede operar como canal de diferentes familias como es RND, MFS (EmrAB de *E. coli*) y ABC (MacAB de *E. coli*) (10).

Pequeña familia de resistencia a múltiples fármacos (SMR: *Small Multidrug Resistance*). Estas bombas de eflujo de pequeño tamaño, otorga a arqueas y bacterias, resistencia a fármacos que presentan estructuras de amonio cuaternario, además de moléculas catiónicas lipofílicas (8).

Un análisis estructural revela la presencia de tan solo 4 hélices transmembrana (TMH) funcionando como heterotrímeros u homodímeros. Tres de las TMH forman una cavidad de unión al sustrato, mientras que la cuarta hélice participa en las interacciones de dimerización (43).

Un modelo representativo de esta familia es la proteína EmrE, y su análisis en *E. coli* por cristalografía de rayos X, crio-EM y RNM manifiesta un conjunto de protómeros dispuestos con un patrón antiparalelo formando un dímero asimétrico (44).

La bomba rota de un estado orientado hacia adentro y hacia afuera durante el proceso de transporte, a través de un cambio conformacional de los dos protómeros. La única diferencia entre los dos estados mencionados es que presentan una orientación contrapuesta en la membrana (45). Son cambios que se producen de manera alostérica por protonación, en concreto de E14 en TMH1 (46).

“Las propiedades del sustrato que se une repercuten en la cantidad transportada por unidad de tiempo”, es decir, influye notablemente en la tasa de transporte. Además, la especificidad de las bombas de eflujo SMR pueden variar con la sustitución de un solo resto en el bolsillo de unión (47).

Entre las bacterias que utilizan bombas de eflujo tipo SMR destacan *Mycobacterium tuberculosis* que mediante el transportador Mmr presenta resistencia a ofloxacino y rifampicina (19); *Acinetobacter baumannii* que usa el transportador AbeS haciendo resistente a la bacteria a cloranfenicol, ciprofloxacino, eritromicina (48); y *Neisseria gonorrhoeae* resistente a aminoglucósidos, penicilina, azitromicina, ceftriaxona gracias al transportador EmrE mencionado anteriormente (45).

Familia de eflujo de compuestos proteobacterianos (PACE). Se trata de una nueva familia de bombas de eflujo de múltiples fármacos creada a partir del descubrimiento de la proteína de expulsión de clorhexidina en la familia *Acinetobacter* spp. (Acel), muy similar a SMR por lo que es común que algunos autores la incluyan dentro de este grupo (49). Los estudios hasta la fecha mostraron que Acel otorga resistencia a clorhexidina a través de un sistema de eflujo activo (4).

Como se ha mencionado anteriormente, la similitud de la familia SMR y PACE hace que, en consecuencia, el tamaño y la estructura de sus proteínas y protómeros sean análogos entre sí, compartiendo incluso los mismos residuos en sus TMH (8).

La ausencia de los genes que codifican estas proteínas en *E. coli*, podría ser una evidencia de que se perdieron durante la evolución de las gamma-proteobacterias (8).

Ensayos bioinformáticos posteriores, han evidenciado homólogos de la proteína de expulsión Acel en numerosas especies y además de la clorhexidina, se han añadido biocidas sintéticos como el benzalconio, la proflavina, la acriflavina y el dequalinio (4).

4.2. Clasificación de los inhibidores de bombas de eflujo:

Los EPIs son moléculas que bloquean de forma eficiente a las bombas de eflujo produciendo la acumulación intracelular de antimicrobianos y haciendo que aumente su efectividad de nuevo (50). Por ello, su uso combinado con antibióticos lo convierte en una estrategia con la que potenciar la acción de los fármacos ya existentes en bacterias que expresen bombas de expulsión (9). A continuación, se desglosan los distintos EPIs dando lugar a tres bloques: inhibidores de origen natural, de origen sintético e inhibidores derivados de microorganismos y en la **Tabla 1** se presenta esa información en forma de resumen.

4.2.1. Según su origen

EPIs de origen natural:

- Flavonoides, flavonas y chalconas. Flavonoides es el nombre general que presenta el grupo de moléculas con estructura polifenólica generadas por el metabolismo secundario de ciertas plantas. Este grupo incluye, entre otras subcategorías, a las flavonas y las chalconas, todas ellas con beneficios para la salud gracias a su acción antioxidante (51).

La baicaleína (5,6,7-trihidroflavona), presenta una actividad antimicrobiana débil, y forma parte de las hojas de *Thymus vulgaris* y *Scutellaria baicalensis georgi*. Al tratar cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) con baicaleína, se pudo

observar un aumento de la susceptibilidad a fluoroquinolonas como ciprofloxacino, y antibióticos β -lactámicos, como oxacilina, cefmetazol y ampicilina (52).

De igual forma, cuando se trató con baicaleína cepas de *Staphylococcus* spp. que sobreexpresan transportadores TetK (Familia MFS), se pudo advertir un aumento en la potencia de la tetraciclina correspondiente a la represión en la absorción de este antibiótico (52).

Se observó que la 5'-metoxi-hidnocarpina, un flavonolignano procedente de *Berberis fremontii*, reprime la bomba de protones impulsora de NorA al tratarse con baicaleína.

El principal inconveniente que presenta es su naturaleza tóxica (53).

Algunas isoflavonas como genisteína, orobol y biochanina A, parecen ser que disminuyen la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de berberina y norfloxacino al bloquear las bombas de eflujo de *Staphylococcus aureus* y *Mycobacterium smegmatis*.

Asimismo, combinaciones de chalconas con cloranfenicol, aumentaron la acción antibacteriana en comparación con la administración única del cloranfenicol, por lo que la resistencia de MRSA se vio reducida (54). Esto pone de manifiesto la presencia de farmacóforos que pueden ser estudiados más en profundidad para tratar resistencias bacterianas (55).

- Alcaloides. La reserpina, compuesto antipsicótico presente en la raíz de *Rauwolfia serpentina*, se ha postulado como un EPI competente que bloquea las bombas de eflujo de las familias MFS y RND (56). La reserpina revierte la resistencia que media el transportador NorA en *S. aureus* al aumentar hasta cuatro veces la actividad de norfloxacino. Sin embargo, su naturaleza nefrotóxica ha impedido su uso en clínica (57). Se consiguió restituir la sensibilidad a los antibióticos en las cepas de *E. coli* utilizando para ello la propia bomba de eflujo AcrAB-TolC, en concreto la estructura de TolC, con la que se diseñó la 3-nitro-6-aminoindol, derivado también del alcaloide reserpina. Con ello se consiguió aumentar la susceptibilidad de cloranfenicol, eritromicina, ciprofloxacino y tetraciclina. A pesar de ello, el uso concomitante de la reserpina con antibióticos no se ha puesto en marcha en humanos por su naturaleza nefrotóxica (58). Otro alcaloide reconocido, la piperina, obtenida de la planta *Piper nigrum* y sus derivados, parece tener actividad de EPI en bacterias clínicamente significativas como *S. aureus* y *Mycobacterium* spp. (6). Ensayos realizados en *S. aureus*, muestran que la piperina inhibe la bomba de eflujo NorA, mejorando la acumulación de ciprofloxacino y, por lo tanto, aumentando la susceptibilidad. Se ha podido demostrar el aumento en la potencia de la actividad de rifampicina al utilizarse junto a la piperina en aislados clínicos

de patógenos, incluyendo *Mycobacterium tuberculosis H37Rv*. Parece inhibir la bomba de eflujo no identificada Rv1258c (9).

- Terpenos. Los EPIs pertenecientes a esta categoría incluyen compuestos diterpénicos fenólicos, como el ácido carnósico y el carnosol, que forman parte del Romero (*Rosmarinus officinalis*). La tetraciclina y la eritromicina aumentaron en potencia en aquellas cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a macrólidos que poseen transportadores MsrA (ABC) y TetK (MFS) (59).

Otro diterpeno fenólico, el totarol, extraído de *Chamaecyparis nootkatensis*, mostró actividad represora de NorA y antimicrobiana potenciando la acción de norfloxacin y bromuro de etidio en cepas de *S. aureus* (59).

Otro compuesto perteneciente a este grupo, el geraniol, un alcohol monoterpénico procedente de *Helichrysum italicum*, tiene como diana las bombas de eflujo especialmente de bacterias Gram negativas. *Klebsiella aerogenes* (anteriormente conocida como *Enterobacter aerogenes*) reduce significativamente el valor de la CMI de cloranfenicol administrado junto a geraniol en aquellas cepas que expresan bombas AcrAB-TolC (60).

- Polifenoles. Se ha demostrado que esta categoría de metabolitos antioxidantes procedente de vegetales, como el galato de epicatequina y el galato de epigallocatequina, disminuye la resistencia de MRSA al inhibir el transportador NorA, aunque de forma débil (61). Antibióticos como tetraciclina, eritromicina y ciprofloxacino vieron incrementada su eficacia al administrarse junto al galato de epigallocatequina en *Campylobacter spp.* y *Estafilococos* en aquellas cepas que expresan la bomba TetK. Las fases del estudio clínico fueron restringidos debido a la condición toxica de este compuesto (9).

EPIs de origen sintético:

- Peptidomiméticos. Se tratan de *moléculas pequeñas no peptídicas capaces de mimetizar o de bloquear las múltiples funciones fisiológicas que desempeñan péptidos y proteínas, a la vez de solventar las limitaciones farmacocinéticas de los péptidos como fármacos* (<https://www.iqm.csic.es/peptidomimeticos/>).

La fenilalanina-arginina-beta-naftilamida (PAβN), es considerada la primera molécula descubierta mediante genética química reconocida como EPI. Consiguió potenciar la

acción de fluoroquinolonas, macrólidos y cloranfenicol, en bacterias Gram negativas gracias a su acción inhibitoria sobre las bombas tipo RND (62).

Una importante bacteria Gram negativa, *Pseudomonas aeruginosa*, que expresa bombas RND tipo MexAM-OprM, incrementó la susceptibilidad a levofloxacin al administrarse junto a PA β N. Se vio potenciada la actividad de levofloxacin tanto en cepas silvestres de *P. aeruginosa* como en aquellas que son capaces de sobre expresar MexAB-OprM. También se vieron inhibidos otros sistemas de eflujo como MexCD-OprJ y MexEF-OprN. Además, PA β N pasó a tener categoría de EPI de amplio espectro por mostrar una actividad inhibitoria similar en sistemas de eflujo característicos de bacterias Gram positivas como la superfamilia ABC, con la bomba AcrAB-TolC (9,63).

Sin embargo, inestabilidad de PA β N mostrada en ensayos preclínicos (ratones y suero humano), llevó a sintetizar un análogo conocido como MC-02,595 (64). Con este nuevo compuesto se pudo solventar cualquier problema anterior, siendo estable en sistemas biológicos y potenciando la acción de levofloxacin al nivel de la molécula original de PA β N, tanto *in vivo* como *in vitro*, contra *P. aeruginosa* (65).

- Quinolona y derivados. El estudio de la estructura-actividad de estas moléculas orgánicas sintéticas puso de manifiesto que la capacidad como EPI es debido al anillo heterocíclico y a una cadena de alquilo lateral que presentan en su esqueleto (63). Las quinolonas y sus derivados, como la quinazolina, puede reestablecer la susceptibilidad de norfloxacin en *E. aerogenes* que sobre expresa AcrAB-TolC, mediante la inhibición competitiva de los exportadores RND (66). La CMI de cloranfenicol, tetraciclina y norfloxacin disminuyeron considerablemente en aislados *in vitro* de *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella aerogenes* (anteriormente conocida como *Enterobacter aerogenes*) cuando se administraron conjuntamente (9).

Otros derivados, como la 2-fenil-4(1H)-quinolona y la 2-fenil-4-hidroxiquinolona, que fueron creadas a partir de la transmutación de flavonas, tienen acción como inhibidores de NorA (familias MFS) en *Staphylococcus aureus* (9).

- Arlpiperazinas y derivados. La estructura que funciona como espaciador entre el anillo de piperazina y el de benceno, junto a la presencia de halógenos en el anillo de benceno, son los encargados de la actividad inhibitoria de estas moléculas N-heterocíclicas. El cribado de alto rendimiento reveló que la 1-(1-naftil metil)-piperazina (NMP), era la molécula que presentaba mayor potencia de todos los derivados de arilpiperazinas probados (67).

NMP fue capaz de reestablecer la susceptibilidad debido a que producía un aumento intracelular dosis-dependiente de ciertos antibióticos. Un ejemplo de ello fue el incremento de la susceptibilidad de levofloxacino sobre en *E. coli* que expresa AcrAB. Además de disminuir la CMI de claritromicina, rifampicina y cloranfenicol (68). El único inconveniente que presentan estos compuestos y sus derivados es la toxicidad en mamíferos por su acción inhibitoria en la recaptación de serotonina (67).

Otro derivado, la 3-arilpiperidina potencia la acción de linazolid al aumentar su acumulación en *E. coli*. Afecta a la función de la bomba AcrAB-TolC, aunque de forma parcial (69).

- Piranopiridina, piridopirimidina y derivados. Se ha informado que análogos de piridopirimidina, como D2 y D13-9001, funcionan como EPIs específicos de la bomba de eflujo MexAB-OprM de *Pseudomonas aeruginosa*. Tanto en condiciones *in vitro* como en ensayos *in vivo* (69).

D13-9001 es capaz de inhibir el eflujo al unirse a los principales sitios de unión en las bombas (AcrB en *E. coli* y MexB en *P.aeruginosa*). El resto hidrofóbico que presenta en su estructura evita los cambios conformacionales que provocan el eflujo; el resto hidrófilo, evita la unión de los sustratos a la bomba (64).

Un derivado sintético, MBX2319, restablece la susceptibilidad de ciprofloxacino, levofloxacino y piperacilina de *E. coli* AB1157. También se observó el aumento en la acumulación intracelular de colorante Hoechst tanto en la cepa salvaje como en *E. coli* que sobre expresa transportadores AcrAB-TolC (70). Un nuevo derivado, MBX3132, se ha informado de que interacciona con AcrB de *Enterobacteriaceae*, inhibiendo de forma alostérica el flujo en bacterias Gram negativas que sobre expresan AcrAB-TolC (71).

EPIs derivados de microorganismos:

Existen estructuras conocidas como EA-371 α y EA-371d, extraídas de la fermentación con *Streptomyces* spp., identificadas específicamente como inhibidores de la bomba MexAB-OprM presente en *Pseudomonas aeruginosa* (72).

El hecho de que haya una pequeña cantidad de inhibidores de bombas de eflujo procedentes de microorganismos abre una nueva puerta para crear derivados que presenten mayor potencia, biodisponibilidad y menos toxicidad que sus antecesores naturales o sintéticos (9).

4.2.2. Según su mecanismo de acción:

EPIs que intervienen en la generación de energía. Procesos como la hidrólisis de ATP, el gradiente de Na^+ o el gradiente de protones son mecanismos generadores de energía de los que dependen las bombas de eflujo (9).

Dentro de este grupo, el más popular y utilizado en los laboratorios en la actualidad sigue siendo el cianuro de carbonilo-m-clorofenilhidrazona, más conocido como CCCP. “Dificulta la fuerza motriz del protón al afectar el potencial transmembrana ($\Delta\psi$) y el pH transmembrana (ΔpH)” (73). Es decir, se ve afectado el metabolismo energético de la célula produciendo la inactivación de la bacteria por completo. Se consiguió reestablecer la susceptibilidad de la tetraciclina gracias a CCCP en *Helicobacter pylori* y *Klebsiella* spp. (74,75). A pesar de las buenas expectativas que ofrece, aún sigue siendo un EPI experimental por su toxicidad en mamíferos (76).

Una molécula sintética, conocida como IITR08027, fue investigada por tener la propiedad de detener el gradiente de protones, pero afectar mínimamente al potencial transmembrana ($\Delta\psi$) (73). El estudio demostró en primer lugar el aumento de la potencia de ciprofloxacino (76), al que se sumaron las fluoroquinolonas en *Escherichia coli* y *Acinetobacter baumannii* que sobreexpresan bombas de eflujo AbeM de tipo MATE (73). Demostró tener una toxicidad mucho menor que el CCCP en células de mamífero por lo que se convierte en un buen candidato para su evaluación pre-clínica (73).

EPIs de unión directa a bombas de eflujo. Como cualquier proteína, la bomba de eflujo puede regularse mediante mecanismos alostéricos. “La unión puede ser competitiva, es decir, la unión del EPI al mismo lugar que el sustrato de la bomba de eflujo de tal manera que la unión del sustrato esté completamente obstruida. Otro tipo de unión puede ser no competitiva, es decir, la unión a la bomba de eflujo de tal manera que su afinidad hacia el sustrato se reduce” (7).

En un estudio con $\text{PA}\beta\text{N}$ (también conocido como MC-207,110), sustrato de bombas tipo RND, se advirtió que aumentaba la potencia de antibióticos como levofloxacina, eritromicina y cloranfenicol en *Pseudomonas aeruginosa* que expresa MexAB, MexCD y MexEF por unión competitiva (77).

Sin embargo, no ocurría lo mismo con tetraciclina y carbenicilina, lo que llevó a pensar que $\text{PA}\beta\text{N}$, en este caso, presentaba sitios de unión distintos en la proteína que ambos antibióticos (62).

Otro mecanismo por el que puede actuar $\text{PA}\beta\text{N}$ es bloqueando los cambios conformacionales de la proteína que producen el eflujo de la bomba (78). Compuestos derivados de indoles han demostrado ser inhibidores específicos al unirse a la cavidad de salida de la bomba de eflujo y cerrar el canal TolC en *E. coli* (79).

Otros estudios han informado de que verapamilo es un sustrato natural de las bombas de eflujo DinD y NorM tipo MATE. Resulta menos tóxica en aquellas bacterias en las que no existe la expresión de estas bombas, lo que indica su especificidad hacia las bombas de eflujo tipo MATE, además de la inhibición competitiva (22). En *Mycobacterium tuberculosis*, verapamilo incrementa la actividad de bedaquilina y ofloxacino (80).

El derivado sintético NMP aumenta la acción de oxacilina, rifampicina, cloranfenicol, claritromicina, fluoroquinolonas, azitomicina, clindamicina, nitrofurantoína y doxicilina aunque en menor medida. Además de potenciar la actividad de levofloxacino, donde se ha observado un incremento de la acumulación en *E. coli* que sobre expresa bombas de eflujo AcrAB y AcrEF (67). La molécula también presenta una acción antibacteriana cuando se utiliza a una concentración mayor de la utilizada como EPI (9).

Tabla 1. Inhibidores de bombas de eflujo.

EPIs de origen natural			
EPI	Bomba de eflujo que inhibe	Bacteria(s) que afecta	Sustrato
Baicaleína	TetK	<i>S. aureus</i> MRSA	Ciprofloxacino Tetraciclina β -lactámicos
5'-MHC	NorA	<i>S. aureus</i>	Berberina Norfloxacino
Genisteína Orobol Biochanina A	NorA	<i>S. aureus</i> <i>M. smegmatis</i>	Berberina Norfloxacino
Chalconas	NorA	<i>S. aureus</i>	Cloranfenicol
Reserpina	NorA, Bmr	<i>B. subtilis</i> <i>S. aureus</i>	Norfloxacino Tetraciclina
Piperina	NorA Rv1258c	<i>S. aureus</i> <i>Mycobacterium</i> spp.	Ciprofloxacino Rifampicina
Ácido carnósico y carnosol	MsrA, TetK	<i>S. aureus</i>	Tetraciclina Eritromicina
Totarol	NorA	<i>S. aureus</i>	Norfloxacino Bromuro de etidio
Geraniol	AcrAB-TolC	<i>Klebsiella aerogenes</i>	Cloranfenicol
Galato de epicatequina, galato de epigalocatequina	NorA, TetK	<i>S. aureus</i> MRSA, <i>Campylobacter</i> spp.	Tetraciclina Eritromicina Ciprofloxacino

Quinazolina	AcrAB-ToIC	<i>K. pneumoniae</i> <i>K. aerogenes</i>	Norfloxacino Cloranfenicol Tetraciclina
EPIs de origen sintético			
3-nitro-6-aminoindol	AcrAB-ToIC	<i>E. coli</i>	Cloranfenicol Eritromicina Ciprofloxacino Tetraciclina
PAβN	MexAM-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, AcrAB-ToIC	<i>P. aeruginosa</i>	Levofloxacino Fluoroquinolonas Macrólidos
2-fenil-4(1H)-quinolona, 2-fenil-4-hidroxiquinolina	NorA	<i>S. aureus</i>	Norfloxacino Ciprofloxacino
NMP	AcrAB, AcrEF	<i>E. coli</i>	Levofloxacino Claritromicina Rifampicina Cloranfenicol
3-arilpiperidina	AcrAB-ToIC	<i>E. coli</i>	Linazolid
Verapamilo	DinD, NorM	<i>M. tuberculosis</i>	Bedaquilina Ofloxacino
MBX2319	AcrAB-ToIC	<i>E. coli</i> AB1157	Ciprofloxacino Levofloxacino Piperacilina
IITR08027	AbeM	<i>A. baumannii</i> <i>E. coli</i>	Ciprofloxacino Fluoroquinolonas
EPIs derivados de microorganismos			
EA-371α, EA-371d	MexABOprM	<i>P. aeruginosa</i>	Levofloxacino

(5'-MHC: 5'-metoxi-hidnocarpina; PAβN: fenilalanina-arginina-beta-naftilamida; NMP: 1-(1-naftil metil)-piperazina).

4.3. Implicación de los inhibidores de bomba de eflujo en la resistencia a los antibióticos:

La literatura muestra que la asociación de fármacos antimicrobianos en el tratamiento de resistencias bacterianas ha tenido una gran acogida para la terapia de infecciones en clínica. El éxito de algunos ensayos de combinación de antibióticos con sustancias de origen natural, como derivados vegetales o productos derivados de microorganismos; o sustancias de origen sintético

como peptidomiméticos, se plantean como una estrategia potencial en la reducción de resistencias. Y resulta de gran importancia en bacterias clínicamente significativas (81,82). Se posiciona como una alternativa de mejora de antibióticos ya existentes, ya que el descubrimiento y síntesis de nuevos antibióticos se ha visto reducido en la última década (83).

La Elaiofilina, un compuesto natural con actividad antimicrobiana producida por *Streptomyces hygroscopicus* (84), presenta propiedades biológicas de interés, tales como actividad antineoplásica (85), de inmunosupresión celular (86), actividad antiviral y antibacteriana (87,88). En el estudio llevado a cabo por Barbosa y colaboradores (2021) (83) se evaluó la aptitud de la Elaiofilina como potenciador de la susceptibilidad en cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes, hacia norfloxacin y bromuro de etidio. Para ello, los autores utilizaron mutantes conocidos como SA-1199 (cepa salvaje) y SA-1199B (cepas que sobre-expresan el transportador NorA). Los autores manifestaron que los resultados obtenidos apuntan al incremento de la eficacia antimicrobiana. La asociación de norfloxacin (NOR) con Elaiofilina produjo una disminución de la CMI para el mutante SA-1199 (de 64 µg/mL a 1,0 µg/mL) y para el mutante SA-1199B (256 µg/mL a 1,0 µg/mL). De la misma manera, el uso concomitante de Elaiofilina y el bromuro de etidio (BrEt), demostró un descenso de la CMI de 64 µg/mL a 1,0 µg en el mutante SA-1199 y de 32 µg/mL a 1,0 µg/mL en SA-1199B. Se vio potenciada la susceptibilidad de las cepas de *S. aureus* de forma general, con ambos EPI (83). Los resultados obtenidos en este trabajo se resumen en la **tabla 2**.

Tabla 2. Evaluación de la capacidad de modificación de la CIM del antibiótico Norfloxacin (NOR) y del Bromuro de Etidio (BrEt) por asociación con Elaiofilina (Barbosa et al., 2021).

	CMI intrínseco (µM)		CMI en presencia de Elaiofilina (µM)	
	NOR	BrEt	Elaiofilina + NOR	Elaiofilina + BrEt
SA-1199 (cepa salvaje)	64	64	1,0	1,0
SA-1199B (mutante de sobreexpresión de NorA)	256	32	1,0	1,0

En otro estudio, Mahey y colaboradores (2021) (89) propusieron la utilización de medicamentos ya existentes y aprobados en clínica para averiguar si alguno de ellos presentaba una actividad parecida a los sustratos naturales de NorA que funcionara como inhibidores de las bombas de eflujo. Para ello, los autores evaluaron seis compuestos con potencial de unión a NorA: raloxifeno (presenta el potencial de acoplamiento más alto) > nefazodona > ezetimiba > clorprotixeno > propafenona > pirvinio. Los ensayos se realizaron en las mismas cepas mutantes

que se utilizaron en el estudio de Barbosa et al., (2021) (83), al que se añadió un tercer mutante de delección de *norA* conocido como K1758. El objetivo era probar la combinación de estos compuestos con norfloxacin y ciprofloxacino, y así establecer la posible existencia de un efecto sinérgico. Los autores han manifestado que al utilizar “concentraciones subinhibitorias” (CMI/4), las CMI de ciprofloxacino (CIP) y norfloxacin (NOR) se vieron reducidas entre 2 y 4 veces en la cepa salvaje SA-1199 (**Tabla 3**) en comparación con el mutante que sobre-expresa el transportador *NorA*, cuyo efecto disminuyó de 8 a 16 veces (**Tabla 4**). Además, el mutante de delección, K175B no reveló una disminución de la CMI en ninguno de los dos antibióticos estudiados (**Tabla 4**). Los autores afirman que los resultados encontrados sugieren que eflujo puede ser consecuencia de la sobreexpresión de las bombas *NorA*, ya la cepa salvaje que expresa *NorA* a niveles basales, produce un aumento en la potencia de los antibióticos de forma débil (89).

Tabla 3. CMI de ciprofloxacino (CIP) y norfloxacin (NOR) en combinación para *S. aureus* SA-1199 (modificación de Mahey et al., 2021).

	CMI intrínseco (µM)	Conc. usada (µM)	CMI en presencia de EPIs (µM)	
			CIP	NOR
			0,5	1
Raloxifeno	>200	50	0,125	0,25
Ezetimiba	>200	50	0,25	0,25
Propafenona	>200	50	0,25	0,5
Clorprotixeno	>200	50	0,25	0,5
Pirvinio	3,125	0,78	0,125	0,25

En cuanto a bacterias Gram negativas, Wang-Kan y colaboradores (2017) (90) demostraron que la inactivación de la bomba *AcrB*, producía una disminución de la virulencia de *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. Como se describió anteriormente, el sistema de eflujo *AcrAB-TolC* de la familia RND, está formado por la bomba de eflujo *AcrB*, la proteína externa de membrana *TolC* y la proteína periplásmica adaptadora *AcrA*. Constituye el complejo de expulsión más importante dentro de la familia *Enterobacteriaceae* (91).

Tabla 4. CMI de ciprofloxacina, norfloxacina, fármacos para *S. aureus* SA-1199B, K1758 solo, y CMI de antibióticos en combinación con diferentes fármacos (modificación de Mahey et al., 2021).

	CMI intrínseco (μM)	Conc. usada (μM)	CMI en presencia de EPIs (μM)		
			<i>S. aureus</i> SA-1199B		<i>S. aureus</i> K1758
			CIP	NOR	CIP
			8	64	0,125
Raloxifeno	200	50	0,5	4	-
Ezetimiba	200	50	0,5	4	-
Propafenona	800	50	1	8	-
Clorprotixeno	200	50	1	8	0,0625
Pirvinio	1,56	0,39	0,5	4	-

Se compararon los datos de la CMI obtenidos de la cepa salvaje SL1344, con la mutante D408A (cepa que sobre-expresa AcrB) y a su vez, con la mutante de delección ΔacrB, que presenta una ausencia total de la proteína AcrB y no solo una pérdida de función (**Tabla 5**). Al igual que en el estudio de Mahey et al., (2021) (89), los resultados obtenidos por los autores apuntaban a que el aumento en la susceptibilidad a los antimicrobianos por parte de *S. typhimurium* podría deberse a la sobreexpresión de la bomba de eflujo MacAB-TolC. En **tabla 5** se resume los resultados obtenidos en dicho estudio.

Tabla 5. CMI de sustratos AcrB para mutantes SL1344 y AcrB (modificación de Wuang-Kan et al., 2017).

	CMI (μM) de los EPIs													
	ACR	ETBR	CIP	NAL	CHL	TET	NOV	FUS	ATM	CAZ	CTX	ERY	OX	MIN
SL1344	512	>2,048	0,030	4	8	2	512	2,048	0,50	1	0,500	256	512	2
ΔacrB	64	32	0,008	1	2	0,5	8	32	0,12	0,25	<0,008	8	16	0,25
D408A	32	32	0,008	1	2	0,5	8	16	0,12	0,25	<0,008	8	16	0,25

(ACR: acriflavina; ETBR: bromuro de etidio; CIP: ciprofloxacina; NAL: ácido nalidixico; CHL: cloranfenicol; TET: tetraciclina; NOV: novobiocina; FUS: ácido fusídico; ATM: aztreonam; CAZ: ceftazidima; CTX: ceftoxitina; ERY: eritromicina; OX: oxaciclina; MIN: minociclina)

Por otro lado, Yuan y colaboradores (2021) (50), descubrieron nuevos EPIs que actúan en las bombas de *P. aeruginosa*, otra bacteria multirresistente de gran importancia por la tasa morbi-mortalidad que presenta. El compuesto conocido como TXA01182 (indol 2-carboxiamida) (**Fig.2**) fue sintetizado específicamente para el ensayo y expone un aumento de la potenciación de levofloxacina hacia *P. aeruginosa* de tipo salvaje (ATCC 27853). Cabe destacar que, en el ensayo llevado a cabo por los autores, se utilizó la cepa salvaje, ya que en las cepas de *P. aeruginosa*

que sobre-expresan bombas tipo RND (MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN y MexXY-OprM), no se produjo ningún incremento de la potencia de forma significativa en comparación con ATCC 27853. Probablemente TXA01182, inhiba a los mutantes de sobre-expresión a través de una bomba de eflujo distinta (50).

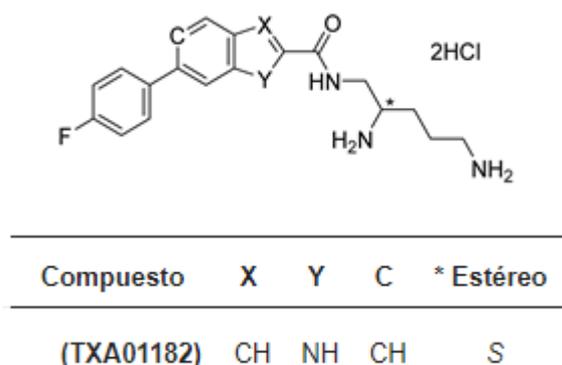


Fig. 2. Estructura líder de los compuestos del cribado virtual (Yuan et al., 2021)

El principal objetivo planteado por Yuan y colaboradores (2021) (50), fue “optimizar la estabilidad metabólica de los EPI en comparación con los peptidomiméticos”, ya que hasta este momento eran considerados los EPI de amplio espectro más potentes contra fluoroquinolonas pero presentaban un alto riesgo de producir toxicidad renal (92). En este sentido, el compuesto TXA01182 fue evaluado en profundidad junto a distintos grupos de antibióticos en la cepa ATCC 27853 (**Tabla 6**) (50).

Tabla 6. Potenciación de diferentes clases de antimicrobianos por TXA01182 frente a P. aeruginosa ATCC 27853 (modificación de Yuan et al., 2021)

	CMI intrínseco (µM)	CMI en presencia de TXA01182 (µM)
A) Levofloxacin	1	0,125
B) Ciprofloxacino	0,25	0,125
C) Levofloxacin	1	0,125
D) Doxiciclina	32	2
E) Minociclina	32	1
F) Tigeciclina	16	4
G) Clotrimoxazol	>256	16
H) Cloranfenicol	>256	32
I) Imipenem	4	4
J) Gentamicina	2	2

K) Aztreonam	8	2
L) Azitromicina	64	32
M) Cefepima	2	1
N) Ceftazidima	2	1

Aun según el estudio llevado a cabo por Yuan y colaboradores (2021) (50), los autores afirman que las fluoroquinolonas, como levofloxacin, ciprofloxacino y moxifloxacino, se vieron potenciadas débilmente por TXA01182. Según los autores, esta evidencia podría justificarse por el hecho de que la CMI de estos antibióticos ya es muy baja en solitario o porque pueden ser expulsadas por otra bomba distinta a la que afecta TXA01182. En relación con las tetraciclinas (dixiciclina, minociclina y tigeciclina), los autores destacan la acción de minociclina de manera significativa, con un aumento de la potencia de 32 veces la CMI original, echo ya esperado por los autores debido a que la minociclina presenta un mayor índice de acoplamiento para las bombas de eflujo y, por tanto, se posiciona como mejor sustrato (93). En el caso del cotrimoxazol y el cloranfenicol, los autores mencionan que la tasa de resistencia fue muy alta (no presentan CMI para *P. aeruginosa* en solitario), cuando comparado con el valor obtenido al combinarse con TXA001182, según los autores este resultado fue un hito del ensayo. Por otra parte, los antibióticos que no eran sustratos de las bombas RND de *P. aeruginosa*, como el imipenem y gentamicina, no sufrieron ningún tipo de potenciación combinados. Finalmente, la unión de TXA01182 con aztreonam, azitromicina, cefepima y ceftazidima expuso una potenciación muy débil, lo que también apunta a que no son sustratos de RND y, por tanto, no inhiben a estas bombas (50). Todos los resultados aquí mencionados están plasmados de forma resumida en la **tabla 6**.

5. Conclusiones:

- Las bombas de eflujo son proteínas de membrana cuya función consiste en exportar sustratos nocivos para las bacterias. Así constituyen un mecanismo de protección celular de gran importancia en la adquisición de multirresistencias.
- De todas las vías por las que los microorganismos pueden disminuir la susceptibilidad a antimicrobianos, son las bombas de eflujo las que se encuentran más extendidas tanto en bacterias Gram positivas, como en bacterias Gram negativas.
- Cada una de las familias de bombas de eflujo otorga una propiedad distinta en cuanto a la afinidad de los sustratos que exporta: mientras que unas bombas son

específicas de un tipo de antibiótico, otras expulsan gran variedad de grupos terapéuticos, lo que provoca que existan bacterias capaces de tolerar más de un antibiótico

- Los inhibidores de bombas de eflujo (EPI) limitan el mecanismo de transporte de las bombas y como consecuencia, se produce un aumento de la concentración intracelular. Este hecho, convierte a estas moléculas en agentes antimicrobianos indirectos, siendo una estrategia competente para restaurar la eficacia de antibióticos ya existentes.
- Numerosos estudios evidencian la capacidad de la Elaiofilina, el Raloxifeno, PA β N, MBX3132 y TXA01182 como inhibidores potenciales de bombas de eflujo. Su desarrollo puede posicionarse como una estrategia novedosa y de gran utilidad en la multirresistencia.

6. Bibliografía:

1. AEMPS. España mantiene el pulso frente a la pandemia silenciosa: la resistencia a los antibióticos [Internet]. 2021 [cited 2022 May 29]. Available from: <https://www.aemps.gob.es/informa/notasinformativas/laaemps/2020-laaemps/espana-mantiene-el-pulso-frente-a-la-pandemia-silenciosa-la-resistencia-a-los-antibioticos/>
2. Brauner A, Fridman O, Gefen O, Balaban NQ. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nat Rev Microbiol*. 2016;14(5):320–30.
3. OMS. Resistencia a los antimicrobianos [Internet]. 2020 [cited 2022 May 23]. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
4. Chitsaz M, Brown MH. The role played by drug efflux pumps in bacterial multidrug resistance. *Essays Biochem*. 2017;61(1):127–39.
5. Dzidic S, Bedeković V. Horizontal gene transfer-emerging multidrug resistance in hospital bacteria. *Acta Pharmacol Sin*. 2003 Jun;24(6):519–26.
6. Kumar A, Khan IA, Koul S, Koul JL, Taneja SC, Ali I, et al. Novel structural analogues of piperine as inhibitors of the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2008 Mar 13;61(6):1270–6.
7. Thakur V, Uniyal A, Tiwari V. A comprehensive review on pharmacology of efflux pumps and their inhibitors in antibiotic resistance. *Eur J Pharmacol*. 2021 Jul 15;903:174151.
8. Du D, Wang-Kan X, Neuberger A, van Veen HW, Pos KM, Piddock LJ v., et al. Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. *Nature Reviews Microbiology*. 2018 Sep 12;16(9):523–39.
9. Sharma A, Gupta VK, Pathania R. Efflux pump inhibitors for bacterial pathogens: From bench to bedside. *Indian J Med Res*. 2019;149(2):129–45.
10. Blair JMA, Richmond GE, Piddock LJ v. Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance. *Future Microbiol*. 2014;9(10):1165–77.

11. Hürlimann LM, Hohl M, Seeger MA. Split tasks of asymmetric nucleotide-binding sites in the heterodimeric ABC exporter EfrCD. *The FEBS Journal*. 2017 Jun 18;284(11):1672–87.
12. Mishra S, Verhalen B, Stein RA, Wen PC, Tajkhorshid E, Mchaourab HS. Conformational dynamics of the nucleotide binding domains and the power stroke of a heterodimeric ABC transporter. *Elife*. 2014 May 16;3.
13. Bountra K, Hagelueken G, Choudhury HG, Corradi V, el Omari K, Wagner A, et al. Structural basis for antibacterial peptide self-immunity by the bacterial ABC transporter McjD. *EMBO J*. 2017;36(20):3062–79.
14. Yamanaka H, Kobayashi H, Takahashi E, Okamoto K. MacAB is involved in the secretion of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *J Bacteriol*. 2008 Dec;190(23):7693–8.
15. Schindler BD, Kaatz GW. Multidrug efflux pumps of Gram-positive bacteria. *Drug Resist Updat*. 2016;27:1–13.
16. Radestock S, Forrest LR. The alternating-access mechanism of MFS transporters arises from inverted-topology repeats. *J Mol Biol*. 2011 Apr 15;407(5):698–715.
17. Kaback HR. A chemiosmotic mechanism of symport. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Feb 3;112(5):1259–64.
18. Nishino K, Latifi T, Groisman EA. Virulence and drug resistance roles of multidrug efflux systems of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol*. 2006 Jan;59(1):126–41.
19. Machado D, Coelho TS, Perdigão J, Pereira C, Couto I, Portugal I, et al. Interplay between Mutations and Efflux in Drug Resistant Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Front Microbiol*. 2017;8:711.
20. Tanaka Y, Hipolito CJ, Maturana AD, Ito K, Kuroda T, Higuchi T, et al. Structural basis for the drug extrusion mechanism by a MATE multidrug transporter. *Nature*. 2013 Apr 11;496(7444):247–51.
21. Ranaweera I, Shrestha U, Ranjana KC, Kakarla P, Willmon TM, Hernandez AJ, et al. Structural comparison of bacterial multidrug efflux pumps of the major facilitator superfamily. *Trends Cell Mol Biol*. 10:131–40.
22. Radchenko M, Symersky J, Nie R, Lu M. Structural basis for the blockade of MATE multidrug efflux pumps. *Nature Communications*. 2015 Nov 6;6(1):7995.
23. Kuk ACY, Mashalidis EH, Lee SY. Crystal structure of the MOP flippase MurJ in an inward-facing conformation. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2017 Feb 26;24(2):171–6.
24. Lu M, Radchenko M, Symersky J, Nie R, Guo Y. Structural insights into H⁺-coupled multidrug extrusion by a MATE transporter. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2013 Nov 20;20(11):1310–7.
25. Jin Y, Nair A, van Veen HW. Multidrug transport protein norM from *Vibrio cholerae* simultaneously couples to sodium- and proton-motive force. *J Biol Chem*. 2014 May 23;289(21):14624–32.
26. Dreier J, Ruggerone P. Interaction of antibacterial compounds with RND efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol*. 2015;6:660.
27. Bolla JR, Su CC, Do S v, Radhakrishnan A, Kumar N, Long F, et al. Crystal structure of the *Neisseria gonorrhoeae* MtrD inner membrane multidrug efflux pump. *PLoS One*. 2014;9(6):e97903.
28. Oswald C, Tam HK, Pos KM. Transport of lipophilic carboxylates is mediated by transmembrane helix 2 in multidrug transporter AcrB. *Nat Commun*. 2016;7:13819.

29. Su CC, Yin L, Kumar N, Dai L, Radhakrishnan A, Bolla JR, et al. Structures and transport dynamics of a *Campylobacter jejuni* multidrug efflux pump. *Nature Communications*. 2017 Dec 1;8(1):171.
30. Kumar N, Su CC, Chou TH, Radhakrishnan A, Delmar JA, Rajashankar KR, et al. Crystal structures of the *Burkholderia multivorans* hopanoid transporter HpnN. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017 Jun 20;114(25):6557–62.
31. Tsukazaki T, Mori H, Echizen Y, Ishitani R, Fukai S, Tanaka T, et al. Structure and function of a membrane component SecDF that enhances protein export. *Nature*. 2011 May 11;474(7350):235–8.
32. Gong X, Qian H, Zhou X, Wu J, Wan T, Cao P, et al. Structural Insights into the Niemann-Pick C1 (NPC1)-Mediated Cholesterol Transfer and Ebola Infection. *Cell*. 2016 Jun;165(6):1467–78.
33. Murakami S, Nakashima R, Yamashita E, Matsumoto T, Yamaguchi A. Crystal structures of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism. *Nature*. 2006 Sep 16;443(7108):173–9.
34. Eicher T, Seeger MA, Anselmi C, Zhou W, Brandstätter L, Verrey F, et al. Coupling of remote alternating-access transport mechanisms for protons and substrates in the multidrug efflux pump AcrB. *Elife*. 2014 Sep 19;3.
35. Seeger MA, Schiefner A, Eicher T, Verrey F, Diederichs K, Pos KM. Structural asymmetry of AcrB trimer suggests a peristaltic pump mechanism. *Science*. 2006 Sep 1;313(5791):1295–8.
36. Nikaido H. Multiple antibiotic resistance and efflux. *Curr Opin Microbiol*. 1998 Oct;1(5):516–23.
37. Eicher T, Cha H jea, Seeger MA, Brandstätter L, El-Delik J, Bohnert JA, et al. Transport of drugs by the multidrug transporter AcrB involves an access and a deep binding pocket that are separated by a switch-loop. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Apr 10;109(15):5687–92.
38. Sjuts H, Vargiu A v, Kwasny SM, Nguyen ST, Kim HS, Ding X, et al. Molecular basis for inhibition of AcrB multidrug efflux pump by novel and powerful pyranopyridine derivatives. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Mar 29;113(13):3509–14.
39. Vargiu AV, Ramaswamy VK, Malvacio I, Mallocci G, Kleinekathöfer U, Ruggerone P. Water-mediated interactions enable smooth substrate transport in a bacterial efflux pump. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2018 Apr;1862(4):836–45.
40. Lin MF, Lin YY, Tu CC, Lan CY. Distribution of different efflux pump genes in clinical isolates of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and their correlation with antimicrobial resistance. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 2017 Apr;50(2):224–31.
41. Swick MC, Morgan-Linnell SK, Carlson KM, Zechiedrich L. Expression of multidrug efflux pump genes *acrAB-tolC*, *mdfA*, and *norE* in *Escherichia coli* clinical isolates as a function of fluoroquinolone and multidrug resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Feb;55(2):921–4.
42. Podnecky NL, Wuthiekanun V, Peacock SJ, Schweizer HP. The BpeEF-OprC Efflux Pump Is Responsible for Widespread Trimethoprim Resistance in Clinical and Environmental *Burkholderia pseudomallei* Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2013 Sep;57(9):4381–6.
43. Bay DC, Rommens KL, Turner RJ. Small multidrug resistance proteins: a multidrug transporter family that continues to grow. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Sep;1778(9):1814–38.
44. Sun J, Bankston JR, Payandeh J, Hinds TR, Zagotta WN, Zheng N. Crystal structure of the plant dual-affinity nitrate transporter NRT1.1. *Nature*. 2014 Mar 6;507(7490):73–7.
45. Morrison EA, DeKoster GT, Dutta S, Vafabakhsh R, Clarkson MW, Bahl A, et al. Antiparallel EmrE exports drugs by exchanging between asymmetric structures. *Nature*. 2012 Jan 18;481(7379):45–50.

46. Gayen A, Leninger M, Traaseth NJ. Protonation of a glutamate residue modulates the dynamics of the drug transporter EmrE. *Nat Chem Biol.* 2016 Mar;12(3):141–5.
47. Lytvynenko I, Brill S, Oswald C, Pos KM. Molecular basis of polyspecificity of the Small Multidrug Resistance Efflux Pump AbeS from *Acinetobacter baumannii*. *J Mol Biol.* 2016 Feb 13;428(3):644–57.
48. Srinivasan VB, Rajamohan G, Gebreyes WA. Role of AbeS, a novel efflux pump of the SMR family of transporters, in resistance to antimicrobial agents in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 Dec;53(12):5312–6.
49. Hassan KA, Liu Q, Henderson PJF, Paulsen IT. Homologs of the *Acinetobacter baumannii* Acel transporter represent a new family of bacterial multidrug efflux systems. *mBio.* 2015 Feb 10;6(1).
50. Yuan Y, Rosado-Lugo JD, Zhang Y, Datta P, Sun Y, Cao Y, et al. Evaluation of Heterocyclic Carboxamides as Potential Efflux Pump Inhibitors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotics.* 2021 Dec 28;11(1):30.
51. López Luengo MT. Flavonoides [Internet]. 2002 [cited 2022 May 23]. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-flavonoides-13028951>
52. Fujita M, Shiota S, Kuroda T, Hatano T, Yoshida T, Mizushima T, et al. Remarkable Synergies between Baicalein and Tetracycline, and Baicalein and β -Lactams against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiology and Immunology.* 2005 Apr;49(4):391–6.
53. Stermitz FR, Lorenz P, Tawara JN, Zenewicz LA, Lewis K. Synergy in a medicinal plant: antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhydronecarpin, a multidrug pump inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Feb 15;97(4):1433–7.
54. Rondevaldova J, Hummelova J, Tauchen J, Kokoska L. *In Vitro* Antistaphylococcal Synergistic Effect of Isoflavone Metabolite Demethyltaxasin with Amoxicillin and Oxacillin. *Microbial Drug Resistance.* 2018 Jan;24(1):24–9.
55. Omosa LK, Midiwo JO, Mbaveng AT, Tankeo SB, Seukep JA, Voukeng IK, et al. Antibacterial activities and structure–activity relationships of a panel of 48 compounds from Kenyan plants against multidrug resistant phenotypes. *Springerplus.* 2016 Dec 27;5(1):901.
56. Stavri M, Piddock LJ v, Gibbons S. Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. *J Antimicrob Chemother.* 2007 Jun;59(6):1247–60.
57. Samosorn S, Bremner JB, Ball A, Lewis K. Synthesis of functionalised 2-aryl-5-nitro-1H-indoles and their activity as bacterial NorA efflux pump inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 2006 Feb;14(3):857–65.
58. Chan BCL, Han XQ, Lui SL, Wong CW, Wang TBY, Cheung DWS, et al. Combating against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* - two fatty acids from Purslane (*Portulaca oleracea* L.) exhibit synergistic effects with erythromycin. *J Pharm Pharmacol.* 2015 Jan;67(1):107–16.
59. Oluwatuyi M, Kaatz GW, Gibbons S. Antibacterial and resistance modifying activity of *Rosmarinus officinalis*. *Phytochemistry.* 2004 Dec;65(24):3249–54.
60. Lorenzi V, Muselli A, Bernardini AF, Berti L, Pagès JM, Amaral L, et al. Geraniol Restores Antibiotic Activities against Multidrug-Resistant Isolates from Gram-Negative Species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2009 May;53(5):2209–11.
61. Gibbons S, Moser E, Kaatz GW. Catechin gallates inhibit multidrug resistance (MDR) in *Staphylococcus aureus*. *Planta Med.* 2004 Dec;70(12):1240–2.

62. Vargiu A v., Nikaido H. Multidrug binding properties of the AcrB efflux pump characterized by molecular dynamics simulations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012 Dec 11;109(50):20637–42.
63. Wang Y, Venter H, Ma S. Efflux Pump Inhibitors: A Novel Approach to Combat Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria. *Curr Drug Targets*. 2016;17(6):702–19.
64. Opperman TJ, Nguyen ST. Recent advances toward a molecular mechanism of efflux pump inhibition. *Frontiers in Microbiology*. 2015 May 5;6.
65. Renau TE, Léger R, Flamme EM, She MW, Gannon CL, Mathias KM, et al. Addressing the stability of C-capped dipeptide efflux pump inhibitors that potentiate the activity of levofloxacin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioorg Med Chem Lett*. 2001 Mar 12;11(5):663–7.
66. Chevalier J, Atifi S, Eyraud A, Mahamoud A, Barbe J, Pagès JM. New pyridoquinoline derivatives as potential inhibitors of the fluoroquinolone efflux pump in resistant *Enterobacter aerogenes* strains. *J Med Chem*. 2001 Nov 8;44(23):4023–6.
67. Bohnert JA, Kern W v. Selected arylpiperazines are capable of reversing multidrug resistance in *Escherichia coli* overexpressing RND efflux pumps. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Feb;49(2):849–52.
68. Schumacher A, Steinke P, Bohnert JA, Akova M, Jonas D, Kern W v. Effect of 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine, a novel putative efflux pump inhibitor, on antimicrobial drug susceptibility in clinical isolates of Enterobacteriaceae other than *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother*. 2006 Feb;57(2):344–8.
69. Y. Mahmood H, Jamshidi S, Mark Sutton J, M. Rahman K. Current Advances in Developing Inhibitors of Bacterial Multidrug Efflux Pumps. *Current Medicinal Chemistry*. 2016 Apr 7;23(10):1062–81.
70. Vargiu A v, Ruggerone P, Opperman TJ, Nguyen ST, Nikaido H. Molecular mechanism of MBX2319 inhibition of *Escherichia coli* AcrB multidrug efflux pump and comparison with other inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014 Oct;58(10):6224–34.
71. Plé C, Tam HK, Vieira Da Cruz A, Compagne N, Jiménez-Castellanos JC, Müller RT, et al. Pyridylpiperazine-based allosteric inhibitors of RND-type multidrug efflux pumps. *Nat Commun*. 2022;13(1):115.
72. Lee MD, Galazzo JL, Staley AL, Lee JC, Warren MS, Fuernkranz H, et al. ChemInform Abstract: Microbial Fermentation-Derived Inhibitors of Efflux-Pump-Mediated Drug Resistance. *ChemInform*. 2010 May 25;32(28):no-no.
73. Bhattacharyya T, Sharma A, Akhter J, Pathania R. The small molecule IITR08027 restores the antibacterial activity of fluoroquinolones against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* by efflux inhibition. *Int J Antimicrob Agents*. 2017 Aug;50(2):219–26.
74. Anoushiravani M, Falsafi T, Niknam V. Proton motive force-dependent efflux of tetracycline in clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *J Med Microbiol*. 2009 Oct;58(Pt 10):1309–13.
75. Fenosa A, Fusté E, Ruiz L, Veiga-Crespo P, Vinuesa T, Guallar V, et al. Role of TolC in *Klebsiella oxytoca* resistance to antibiotics. *J Antimicrob Chemother*. 2009 Apr;63(4):668–74.
76. Osei Sekyere J, Amoako DG. Carbonyl Cyanide m-Chlorophenylhydrazine (CCCP) Reverses Resistance to Colistin, but Not to Carbapenems and Tigecycline in Multidrug-Resistant Enterobacteriaceae. *Front Microbiol*. 2017;8:228.
77. Lomovskaya O, Warren MS, Lee A, Galazzo J, Fronko R, Lee M, et al. Identification and Characterization of Inhibitors of Multidrug Resistance Efflux Pumps in *Pseudomonas aeruginosa* :

- Novel Agents for Combination Therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2001 Jan;45(1):105–16.
78. Reading E, Ahdash Z, Fais C, Ricci V, Wang-Kan X, Grimsey E, et al. Perturbed structural dynamics underlie inhibition and altered efflux of the multidrug resistance pump AcrB. *Nature Communications*. 2020 Dec 4;11(1):5565.
 79. Green AT, Moniruzzaman M, Cooper CJ, Walker JK, Smith JC, Parks JM, et al. Discovery of multidrug efflux pump inhibitors with a novel chemical scaffold. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2020 Jun;1864(6):129546.
 80. Gupta S, Cohen KA, Winglee K, Maiga M, Diarra B, Bishai WR. Efflux Inhibition with Verapamil Potentiates Bedaquiline in Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2014 Jan;58(1):574–6.
 81. Coutinho HDM, Costa JGM, Lima EO, Falcão-Silva VS, Siqueira-Júnior JP. Enhancement of the Antibiotic Activity against a Multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* and Chlorpromazine. *Chemotherapy*. 2008;54(4):328–30.
 82. Coutinho HDM H, Brito SMO SMO, Leite NF N, Vandesmet VCS VCS, Oliveira MTA MTA, Martins GMAB GMAB. Evaluación comparativa de la modulación de antibióticos frente a cepas bacterianas de *Escherichia Coli*, *Staphylococcus*. *Ciencias de la Salud*. 2015 Nov 24;13(3):345–54.
 83. Rodrigues dos Santos Barbosa C, Feitosa Muniz D, Silvino Pereira P, Maria de Arruda Lima S, Datiane de Moraes Oliveira Tintino C, Cintia Alexandrino de Souza V, et al. Evaluation of Elaiophylin extracted from *Streptomyces hygroscopicus* as a potential inhibitor of the NorA efflux protein in *Staphylococcus aureus*: An in vitro and in silico approach. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2021 Oct;50:128334.
 84. Lima SMA, Melo JanaínaGS, Militão GCG, Lima GMS, do Carmo A. Lima M, Aguiar JS, et al. Characterization of the biochemical, physiological, and medicinal properties of *Streptomyces hygroscopicus* ACTMS-9H isolated from the Amazon (Brazil). *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2017 Jan 18;101(2):711–23.
 85. Wang G, Zhou P, Chen X, Zhao L, Tan J, Yang Y, et al. The novel autophagy inhibitor elaiophylin exerts antitumor activity against multiple myeloma with mutant TP53 in part through endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Cancer Biology & Therapy*. 2017 Aug 3;18(8):584–95.
 86. Zhao X, Fang Y, Yang Y, Qin Y, Wu P, Wang T, et al. Elaiophylin, a novel autophagy inhibitor, exerts antitumor activity as a single agent in ovarian cancer cells. *Autophagy*. 2015 Oct 3;11(10):1849–63.
 87. Wu C, Tan Y, Gan M, Wang Y, Guan Y, Hu X, et al. Identification of Elaiophylin Derivatives from the Marine-Derived Actinomycete *Streptomyces* sp. 7-145 Using PCR-Based Screening. *Journal of Natural Products*. 2013 Nov 22;76(11):2153–7.
 88. Song X, Yin Z, Zhao X, Cheng A, Jia R, Yuan G, et al. Antiviral activity of sulfated Chuanmingshen violaceum polysaccharide against Newcastle disease virus. *Journal of General Virology*. 2013 Oct 1;94(10):2164–74.
 89. Mahey N, Tambat R, Chandan N, Verma DK, Thakur KG, Nandanwar H. Repurposing Approved Drugs as Fluoroquinolone Potentiators to Overcome Efflux Pump Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Microbiology Spectrum*. 2021 Dec 22;9(3).
 90. Wang-Kan X, Blair JMA, Chirullo B, Betts J, la Ragione RM, Ivens A, et al. Lack of AcrB Efflux Function Confers Loss of Virulence on *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *mBio*. 2017;8(4).
 91. Du D, van Veen HW, Luisi BF. Assembly and operation of bacterial tripartite multidrug efflux pumps. *Trends in Microbiology*. 2015 May;23(5):311–9.

92. Lomovskaya O, Bostian KA. Practical applications and feasibility of efflux pump inhibitors in the clinic—A vision for applied use. *Biochemical Pharmacology*. 2006 Mar;71(7):910–8.
93. Fluit AC, Florijn A, Verhoef J, Milatovic D. Presence of tetracycline resistance determinants and susceptibility to tigecycline and minocycline. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Apr;49(4):1636–8.

